

植物病原真菌的超微结构

ULTRASTRUCTURE OF PLANT PATHOGENIC FUNGI

康振生 著



中国科学技术出版社

植物病原真菌的超微结构 ULTRASTRUCTURE OF PLANT PATHOGENIC FUNGI

潘文江 著



中国环境出版社

植物病原真菌的超微结构

Ultrastructure of Plant Pathogenic Fungi

康振生 著

Zhensheng Kang

(西北农业大学)

(Department of Plant Protection,

Northwestern Agricultural University, Yangling, Shannxi)

(中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学开放研究实验室)

(Systematic Mycology & Lichenology Laboratory,

Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing)

中国科学技术出版社

China Science & Technology Press

Beijing

图书在版编目(CIP)数据

植物病原真菌的超微结构/康振生著. —北京:中国科学技术出版社,1995.12

ISBN 7-5046-2174-9

I. 植… II. 康… III. 植物病原真菌—超微结构—研究 IV. Q939.5

中国版本图书馆 CIP 数据核字(96)第 02004 号

中国科学技术出版社出版

北京海淀区白石桥路 32 号 邮政编码:100081

新华书店北京发行所发行 各地新华书店经售

陕西省印刷厂印刷

开本:787×1092 毫米 1/16 印张:13.5 字数:32.4 千字

1995 年 12 月第 1 版 1996 年 2 月第 1 次印刷

印数:1—1100 册 定价:45.00 元

内容简介

本书为我国第一本关于植物病原真菌超微结构方面的专著。它结合大量的电子显微镜照片,较系统地介绍了鞭毛菌、接合菌、子囊菌、担子菌和半知菌各大类群的超微结构特征,其中包括菌丝体细胞结构、各类无性孢子和有性孢子的发育及形态结构、吸器的形态与发育,以及病原真菌与寄主植物相互作用的超微结构和细胞化学特征。同时本书还简要介绍了植物病原真菌超微结构的研究概况,以及研究技术的原理和方法。全书共分七章,刊登电镜照片 413 张。

本书适于植物病理学专业的科技人员、高等农业院校的师生参阅,也可供生物专业、微生物专业及相关学科的师生、科研人员参考。

前 言

电子显微镜的问世和生物电镜样品制备方法的日趋完善,不仅开扩了人们的眼界,丰富了人们对微观世界的认识,而且极大地推动了生物学科中许多学科领域的发展。今天,电子显微镜已成为生物科学研究中的重要工具。植物病原真菌的超微结构研究始于50年代末期,至今已有30多年的历史了。在此过程中,该研究领域由静态地描述病原真菌的微观形态结构,发展到动态地揭示病菌的发育过程以及与寄主植物的相互关系。特别近十几年来电镜细胞化学技术不断发展,进一步促进了真菌超微结构研究向着探索结构与功能关系的方向发展,而且随着我国电子显微镜的逐渐普及,生物电镜技术已在植物病理学和真菌学中得到广泛的应用。近年来,作者在国家教委“优秀年轻教师基金”、国家自然科学基金和中国科学院微生物研究所真菌地衣系统学开放实验室的资助下,结合我国植物病害的发生特点,对一些典型的植物病原真菌进行了系统的观察,经对观察结果的总结和整理,写成了这本《植物病原真菌的超微结构》。

本书结合大量的电镜照片,较系统地介绍了植物病原真菌各大类群的超微结构特征,其中包括真菌体细胞结构,各类无性孢子和有性孢子的发育及形态结构,吸器的形态与结构,以及寄主细胞对病菌入侵反应的特征等。同时还简要介绍了植物病原真菌超微结构的研究历史和涉及的基本技术。全书共为七章,刊登电镜照片413张,除个别署名照片外,其余均为作者观察所拍。

近年来,作者在植物病原真菌超微结构的研究过程中,曾先后得到西北农业大学植保系李振岐教授、中国科学院微生物研究所魏江春教授和庄文颖教授的大力支持和关心,西北农业大学植保系魏国荣老师、黄丽丽副教授,赵德金老师为本书做了大量的准备工作,薛文霞和赵会银同志为本书录入和打印了初稿,加拿大温尼泊农业试验站J. Chong博士为本书提供了快印膜,在此特向他们致以诚挚的谢意。对《真菌学报》、《Mycological Research》、《Journal of Cell Science》允许引用所发表的照片,对L. R. Tiedt博士、L. Morin博士、A. Beckett博士、D. J. S. Barr博士、G. Hyde博士及瑞士巴塞尔大学扫描电镜室(University of Basel, SEM—Laboratory, Bernoullistr, Basel, Switzerland)惠赠的有关照片表示衷心感谢。

植物病原真菌涉及种类甚多,由于时间和经费所限,本书介绍的内容仍存在一定的局限性,并且植物病原真菌超微结构涉及到多个学科,加之作者水平有限,书中难免有错漏之处,尚望读者不吝批评指正。

康振生

1995年6月25日

目 录

前 言

第一章 绪论	(1)
一. 超微结构的概念	(1)
二. 植物病原真菌超微结构的研究简况	(1)
三. 电镜技术在植物病原真菌学研究中的作用	(4)
第二章 植物病原真菌超微结构研究技术的原理和方法	(5)
一. 植物病原真菌样品的准备	(5)
(一)样品的准备	(5)
(二)样品的抽气处理	(6)
二. 电镜样品的常规制备技术	(7)
(一)透射电子显微镜样品的制备	(7)
(二)扫描电镜样品的制备	(9)
三. 电镜样品的低温制备技术	(11)
(一)冷冻置换技术	(11)
(二)冷冻蚀刻技术	(12)
(三)低温包埋技术	(13)
(四)冷冻干燥技术	(13)
(五)低温扫描电子显微镜技术	(14)
四. 免疫电子显微技术	(14)
(一)铁蛋白标技术	(15)
(二)酶标记技术	(15)
(三)胶体金技术	(15)
五. 电镜细胞化学技术	(17)
(一)碳水化合物的电镜定位技术	(17)
(二)酶类的电镜细胞化学定位	(20)
(三)蛋白质的电镜细胞化学定位	(21)
(四)核酸的电镜细胞化学定位	(21)
六. X-射线显微分析	(22)
七. 微波辐射固定技术	(22)
第三章 鞭毛菌的超微结构	(24)
一. 体细胞结构	(24)
(一)营养体的结构与细胞器	(24)
二. 吸器的发育与结构	(26)
(一)吸器的发育	(26)
(二)吸器的形态与结构	(27)
三. 寄主细胞的反应	(29)

四、无性繁殖	(30)
(一)孢子囊梗的发育	(30)
(二)孢子囊的形成与结构	(31)
(三)游动孢子的形成与结构	(32)
(四)休止孢的形成与萌发	(34)
五、有性生殖	(35)
六、侵染过程	(36)
第四章 接合菌的超微结构	(38)
一、体细胞结构	(38)
二、无性繁殖	(38)
(一)孢囊的形成	(39)
(二)孢囊原生质的割裂过程	(39)
(三)孢囊孢子壁的形成	(40)
(四)孢囊囊轴的发育	(40)
三、有性繁殖	(40)
第五章 子囊菌的超微结构	(42)
一、子囊菌的一般特征	(42)
二、半子囊菌纲	(43)
三、不整子囊菌纲	(44)
四、核菌纲	(44)
(一)白粉病菌	(45)
(二)小麦赤霉病菌	(49)
(三)小麦雪霉叶枯病菌	(50)
(四)黑痣菌	(52)
四、腔菌纲	(52)
五、盘菌纲	(52)
(一)子囊盘的结构	(53)
(二)菌核的结构	(54)
(三)子囊孢子的形成	(54)
第六章 担子菌的超微结构	(56)
一、担子菌的一般特征	(56)
二、锈菌的超微结构	(58)
(一)夏孢子阶段	(58)
(二)冬孢子堆与冬孢子	(68)
(三)担孢与担孢子	(69)
(四)性孢子器和性孢子	(70)
(五)锈孢子器和锈孢子	(70)
三、黑粉菌的超微结构	(71)

四、层菌纲的超微结构.....	(73)
第七章 半知菌的超微结构	(75)
一、一般形态结构特征.....	(75)
二、丝孢子纲.....	(76)
(一)丝孢目	(76)
(二)束梗孢目	(77)
(三)瘤座孢目	(77)
(四)无孢目	(78)
三、腔孢纲.....	(78)
参考文献	(80)

第一章 绪 论

一、超微结构的概念

人类对于生物结构,最初只能在肉眼观察所及的范围内建立起早期的形态研究,但由于人的视力限制,对微小物体的结构往往无法辨认。17 世纪光学显微镜的发明,突破了人类的生理限制,使人们看清了细胞和细菌的形态结构,并促进了细胞学的建立和发展,从而使人类对生物微观世界的认识发生了一次飞跃。然而,光学显微镜的分辨率也是有限的,一般只能观察到大于 0.1 微米的物体,若要观察更小的细微结构就显得无能为力了。20 世纪 30 年代电子显微镜的问世,则打破了这一界限,这给观察生物细胞的微观结构带来了革命性的变化。随着电子显微镜技术的迅速发展和超薄切片技术的不断完善,电镜观察的分辨率可达 $10\sim 25\text{ \AA}$,使人们对生物体细胞结构的观察推进到亚细胞境界,可直接观察到生物细胞内各种细胞器和膜系统、病毒粒子及大分子物质的形态结构。这不仅开扩了人们的眼界,丰富了人们对微观世界的认识,而且大大推动了生物学中许多学科领域的发展。超微结构(ultrastructure)一词显然是随电子显微镜在生物学中的应用而派生出来的,一般系指在电子显微镜下所观察到的形态结构,在有的文献中,也有人采用细微结构(fine structure)、亚细胞结构(subcellular structure)或亚显微结构(submicroscopic structure)来描述电子显微镜下观察到的结构。

二、植物病原真菌超微结构的研究简况

据 Bracker C. E. (1967),植物病原真菌的超微结构研究始于 50 年代末期,迄今已有 30 多年的历史。尽管植物病原真菌超微结构研究的起步较晚,但随后的发展较为迅速,特别是电镜技术和生物制样技术的不断改进,细胞化学方法的相继出现,促进了该研究领域的发展。根据植物病原真菌超微结构研究发展的特点,可将这 30 多年来的研究工作大体分为起始阶段、迅速发展阶段和深入发展三个阶段。

(一)从 50 年代末到 60 年代中期,为植物病原真菌超微结构研究的起始阶段。在这几年里,由于作为研究工具的电子显微镜尚未全面普及,利用电镜开展真菌超微结构的研究工作受到限制,并且研究对象大都仅涉及到一些引起重要植物病害的真菌种类,如锈菌、白粉菌、霜霉菌、腐霉菌、根肿菌等。这一阶段的超微结构研究主要是了解这些病菌的微观特征,同时也初步涉及到了病菌生长发育过程和结构与功能间的关系等。Ehrlich 和 Ehrlich(1961,1962,1963,1966)通过反复观察小麦秆锈菌菌丝、吸器母细胞、吸器的结构,初步确定了锈菌微观结构的基本模式;Moore R. T. 等(1961,1962)曾先后报道真菌细胞中的一些独特的结构,如须边体(lomasome),担子菌的桶状隔膜孔结构;Fuller M. S.

(1965,1966),Reichle 和 Fuller (1967), Lessie (1967), Moore (1965), Berlin J 等(1964) 观察发现不同类型鞭毛菌的游动孢子在形态、细胞器的分布、鞭毛的着生位点方面均存在明显差异,鞭毛中的微管排列以“9+2”式为其结构特征;Fuller (1965,1966) 等报道了游动孢子以原生质割裂的方式形成;Carroll G. C. (1966) 描述了子囊孢子形成的过程及特征;Wells (1964) 报道了有隔担子菌类(Heterobasidiomycetes)和无隔担子菌类(Homobasidiomycetes)孢子的产生方式。尽管第一阶段的研究进展较慢,但已基本揭示了真菌各大类群的菌丝、孢子以及孢子产生的超微结构特征,为随后的工作奠定了不可缺少的基础。Bracker C. E. 于 1967 年发表在植物病理学年鉴上的《真菌超微结构》一文,就这一阶段的研究工作做了较为全面的总结和评价。

(二) 从 60 年代中期至 70 年代末期为植物病原真菌超微结构研究的迅速发展阶段,在此阶段该研究领域具有以下三个明显的特点:

1. 由于电子显微镜的逐渐普及和样品固定技术的不断完善,植物病理学专家和真菌学专家逐渐认识到生物电镜技术在植物病理学和真菌学研究中的作用。因而在世界范围内,许多植物病理学家和真菌学家纷纷涉入植物病原真菌超微结构的研究,并形成了多个高水平的研究小组,这在锈菌的研究方面尤为突出。以 D. Harder 博士为首的加拿大温尼泊小组,主要研究小麦秆锈菌(*Puccinia graminis*)和燕麦冠锈菌(*P. coronata*)的超微结构及与寄主的相互关系;美国北大科他州立大学 Littlefield L. J. 教授领导的小组,以亚麻锈菌(*Melampsora lini*)为研究对象;加拿大多伦多大学 M. C. Heath 教授的小组开展了菜豆锈菌(*Uromyces phaseoli*)发育与寄主抗性关系和非寄主抗性的研究,原联邦德国 Konstanz 大学的 K. Mendgen 教授就多种锈菌冬孢子发育、担孢子产生及入侵开展了大量的研究。由于研究人员的增多,使得研究对象的种类不断拓宽,从而不再仅仅涉及到一些重要的病原真菌,而且也对一些具有典型生物学意义的真菌进行了研究。

2. 研究目的由过去静态地描述其微观结构转为研究真菌各种结构发育的动态过程,并从植物病理学方面来考虑病菌与寄主在超微结构方面的关系。Aist 和 Williams (1971) 揭示了芸苔根肿菌游动孢子侵入甘蓝根毛的过程;Littlefield (1972), Littlefield 和 Bracker (1973) 等首次描述了锈菌吸器的发育过程,并发现吸器在寄主细胞内的形成并未刺破寄主细胞质膜进入寄主原生质内,而是被下凹的寄主质膜将吸器与寄主原生质所隔开;Day 和 Scott (1973) 研究了大麦白粉病菌的侵染过程以及分生孢子梗、分生孢子的形成;Morrison (1977)、Pommerville 和 Fuller (1976) 对异水霉(*Allomyces macrogynus*) 的配子和授精过程的细胞学特征做了精美的描述;Lu (1974), Aist, Williams 和 Heath (1978) 曾先后记述了真菌细胞核的分裂过程;Olson 和 Reichle (1978), Harder 等 (1978, 1978) 首次采用抗病和感病的近等基因系小麦,揭示了小麦秆锈菌在表现毒性和非毒性时寄主与病原在超微结构上的变化特征。

3. 在描述病原真菌的微观特征时,注意了探索结构与功能的关系。Grove 和 Bracker (1971), Grove 等 (1970) 根据菌丝生长顶端部位原生质成分的排列状况,提出了菌丝顶端生长的模式,这一模式迄今仍广泛被人们接受;Bushnell 和 Gay (1978) 直接证实了白粉菌吸器具有摄取营养的功能;Aist 和 Williams (1971) 曾报道芸苔根肿菌游动孢子内具独

特的管腔(rohr)和棘杆(stache)结构,并发现管腔和棘杆具穿透寄主细胞壁和将孢子内原生质导入寄主细胞的功能;Rijkenbery (1975), Harder (1978)等发现在被锈菌侵染的寄主细胞内,其吸器四周通常存在有一些特殊的管状复合体,由于复合体为膜结构,它的出现实际上是增大了膜的表面积,故他们推测这些管状结构有助于寄主细胞中的营养物质向吸器输送,后来的细胞化学研究间接地证实了这一观点。

在第二阶段中,大量有关真菌超微结构的论文分别在国际上一些重要的学术刊物上发表,如《加拿大植物学》(Canadian Journal of Botany),《真菌学》(Mycologia),《细胞生物学》(J. Cell Biol.)《美国植物学》(Am. J. Bot.),《植物病理学》(Phytopathology)等杂志上,并且出版了《真菌的超微结构图谱》(Beckett 等,1974),《锈菌的超微结构》(Littlefield 和 Heath, 1979),《植物病原真菌的扫描电镜观察》(Brown 和 Brotzman, 1979)等专著。由 C. J. Alexopoulos 和 C. Mims(1979)所编著的《真菌学概论》一书较为系统地反映了该阶段中真菌超微结构研究的进展情况。

(三)从 80 年代初至今为植物病原真菌超微结构研究的深入发展阶段。在此阶段,新技术、新方法的出现为超微结构研究增添了新的内容,从而为更深入地了解结构与功能间的关系提供了新的途径,因而植物病原真菌超微结构研究领域出现以下两大特征:

1. 样品固定新技术的出现和应用,使得电镜观察结果大大地减少了因化学固定造成的假象,而更加接近其自然状态。这些新技术包括冷冻置换固定技术、高压冷冻置换固定技术、低温包埋技术、低温扫描电镜技术、冷冻蚀刻技术、连续切片的电子计算机重组技术、高压电镜技术、微波辐射固定技术等。Hoch (1983)采用冷冻置换固定技术处理真菌菌丝后观察发现,该技术对样品的保存效果明显优于常规的化学固定方法,菌丝细胞基本保持着固定前的生活状态,其细胞膜平滑、着色均匀,细胞核外膜不仅平滑,而且两膜间呈平行状态;Knauf 等 (1989)利用高压冷冻置换技术重新对菜豆锈菌进行了研究,结果发现吸器壁和吸器外质膜平滑,相互平行,在吸器母细胞入侵点处,入侵栓的壁膜保持完好,清楚可辨;Hyde 等(1991)在采用高压冷冻固定技术再度观察疫霉游动孢子的形成过程时,发现游动孢子的割裂方式不同于目前广泛接受的模式,并提出了更接近实际的新模式;Kang 等(1991)首次研制出了适宜于真菌、植物材料的微波固定技术,该技术不仅能完好保存样品的细胞结构,而且对体表抗原位点的保存作用是常规方法的二倍。

2. 植物病原真菌的超微结构研究超越了单纯的形态学范畴,而是广泛与组织化学、免疫学和多种标记技术相结合,逐步发展成为将结构研究与功能研究结合为一体的电镜细胞化学技术。这些电镜细胞化学技术包括碳水化合物定位、蛋白质定位、酶定位、核酸定位技术、凝集素标记技术、免疫电镜技术、X-射线微量分析技术等,并在此基础上衍生出双重标记、多重标记技术、前包埋和后包埋技术、DNA 原位杂交技术等。在病菌与寄主相互关系的研究中,病菌与寄主接触部位的化学成分在两者相互识别、信息交流过程中起着重要作用。然而,这些化学成分很难采用常规的生化技术来进行分析,而电镜细胞化学技术则提供了一条可行的途径。Chong 等 (1985, 1986)、Ebrahim-Nesabat 等(1986,1982)、康振生等(1994)采用 Thierry 和 Roland 染色法对小麦秆锈菌、小麦白粉菌和小麦条锈菌中的碳水化合物进行了分析,Rohringer (1989), Benhamou (1987, 1988), 康振生等

(1994)采用多种凝集素—胶体金探针测定了小麦秆锈菌、*Ascosalyx abietin*、尖孢镰刀菌(*Fusarium oxysporum*)、小麦条锈菌中的半乳糖,已酰半乳糖,葡萄糖,甘露糖,已酰壳糖等糖基的分布特征;J. Sock, R. Rohringer 和 Z. kang (1990)采用免疫电镜技术测定了小麦秆锈菌和小麦中 β -1,3 葡聚糖酶的分布状况,发现在菌丝体表、吸器外间质内和小麦细胞表面均有该酶的存在;Woods 等(1983,1987)在研究十字花科白锈菌(*Albugo candida*)与其寄主细胞相互交接面时,通过 ATP 酶定位分析,证实吸器外质膜的生理特征已不同于健康部位的寄主质膜。E. W. Boehm 等(1992)采用连续切片和电子计算机三维结构重组技术,成功地确定了小麦秆锈菌冬孢子细胞核的核型(karyotype)。

在第三阶段,先后出版了《微生物的超微结构研究技术》(H. C. Aldrich 和 W. J. Todd, 1986)、《真菌孢子及引致的植物和动物病害》(Cole G. T. 和 Hoch H C, 1991)、《植物病原物的电镜研究》(Mendgen K. 和 Lesemann D. F. 1991)等专著,并且在许多植物病理学或真菌学的专著中都有专门介绍相应病原真菌超微结构研究进展的章节(Harder 1984; Harder and Chong, 1984; Cooper, 1981)。

三、电镜技术在植物病原真菌学研究中的作用

电子显微镜较高的放大倍数和相应发展起来的细胞化学技术,使电子显微镜已成为生物科学研究中强有力的工具。就植物病原真菌和植物病理学研究而言,概括起来电子显微镜技术具有以下几方面的作用:

1. 观察了解植物病原菌的基本形态和结构,并且通过样品的连续切片技术,可重组出病菌某些部位或器官的三维结构。

2. 采用系统取样方法和连续切片技术,观察认识植物病原真菌发育过程及其特征。

3. 采用电镜细胞化学技术,可测定分析植物病原菌不同结构中不同化学成分分布特征,从而为揭示结构与功能间的关系提供证据。

4. 观察研究病原菌在寄主植物上的侵染过程,揭示病原菌是如何接触和侵入寄主,以及在寄主内又是怎样定殖和发展。

5. 观察研究寄主植物的抗病机制,明确在病菌侵染过程中,寄主植物在细胞水平和亚细胞水平上是如何做出相应反应的,以及到病菌发育最终受抑时,寄主在形态和结构上有什么变化。在抗病机制的研究中,在采用电镜观察的同时,结合生化分析比仅采用其中方法之一所获结果更具有说服力。

6. 通过系统观察经杀菌剂处理后的病菌细胞内外的变化特征,可揭示出杀菌剂的作用方式与特点。

第二章 植物病原真菌超微结构研究技术的原理和方法

一般透射式电子显微镜的电子束穿透能力较弱,大多数样品都无法直接在电镜下进行观察,因而生物样品在进行电子显微观察之前,都必须经过固定、脱水、包埋、超薄切片、染色等处理。生物样品处理是否得当,直接影响到生物样品的形态、结构和其中的化学成分,故生物样品处理的技术与方法在生物电镜研究中一直颇受重视。在过去几十年中,为了使生物样品在处理过程中尽可能保持其自然形态与结构,以及其中的固有成分,不仅对电子显微镜的结构进行了改进,研制了高压电子显微镜、低温电子扫描显微镜,而且对生物样品的处理方法进行了不断的摸索,使其方法日趋完善,除目前广泛使用的戊二醛-锇酸双重固定方法外,一些新的技术与方法,如超低温冷冻置换固定技术、冰冻蚀刻技术、低温干燥技术及低温包埋技术等也已相继用于生物样品的处理。近年来,电镜技术在生物学中的应用已超越了单纯形态结构研究的范畴,而与免疫学、细胞化学、放射性同位素标记等技术相结合,形成了免疫电镜技术、电镜细胞化学技术、放射自显影技术等,用于研究细胞内特定蛋白质、糖类等物质的定位与探索这些物质在细胞中的合成、转移以及其生理功能。将静止的形态学观察与动态生理功能研究相结合的新型电镜技术为生物学研究提供了新的方法与途径。

植物病原真菌电镜样品的制备技术和方法与其它生物样品采用的技术基本相似,但是植物病原菌的个体微小、种类繁多、形态各异,并涉及到寄主植物,因而它们的样品制备仍具有特殊性。

一、植物病原真菌样品的准备 (Preparation of plant pathogenic fungi)

电镜观察一般放大倍数较高,观察的范围相对减小,因而要求所取用于电镜样品制备的材料部位要准确,必须要带有需观察的植物病原真菌的结构。一般来讲,在开展电镜工作之前,需做好前期的光镜观察。

(一)样品的准备

植物病原真菌电镜样品的准备有以下方法:

1. 室内培养

根据研究对象的特点,选择适宜的培养基,在室内按常规方法进行培养。在培养过程中,按不同时间分别取样,便可获得病菌不同发育阶段的结构。该方法简单易行,多适宜于研究大多数非专性寄生真菌的形态结构和发育。

2. 田间采样

根据感病植物的症状特征,可从田间自然发病植物上采取所需的样品。采样时最好选择较为新鲜的病斑,需注意的是同一病斑上不同位置中的真菌其发育进程不完全一致,位于病斑中心部位的菌丝体一般菌龄较大,而病斑边缘部位的菌丝体一般较幼嫩,因而可根

据试验要求切取病斑的具体部位。

3. 人工接种

对于专性寄生的植物病原真菌,或者目的在于研究植物病原真菌与寄主的相互作用,通常需采用人工接种的方法。接种时,病原菌的接种量需有所增大,以便使接种部位能形成较多的侵染结构和菌落,这样在随后的切片定位时,较容易发现病菌的结构。

4. 其它方法

病原真菌的孢子囊、分生孢子在固定、脱水过程中易从孢囊梗或分生孢子上脱落或冲掉,因而样品准备需采用特殊的方法。首先可用无菌水将孢子囊或分生孢子从植物发病部位或培养皿内冲洗到试管内,加入适量的戊二醛(最终浓度不超过4%)。随后将孢囊或分生孢子悬浮液进行离心,使其沉积于离心管底。最后弃去上清液,用数滴4%的戊二醛固定液使沉积的孢子囊或分生孢子再次悬浮,再加入2%已熔化的琼脂,这样琼脂的凝固则可将孢囊和分生孢子固定在其中。

对于游动孢子的悬浮液,除可采用上述离心的方法外,也可以通过过滤的方法将游动孢子附着在滤纸上,以便于进一步的处理。

为了便于随后样品的一系列处理,对以上方法所获的材料,需用刀片切成小块。材料块的大小要适度,材料块太大,固定液不容易透入,造成材料内外固定不一,太小则材料受伤的程度增大,容易产生假像。用于透射电镜观察的材料,一般切成 $1\text{mm} \times 2\text{mm}$ 的条状块为合适,而用于扫描电镜观察的材料可适当大一些。

由于扫描电镜仅能观察样品表面的结构,因而当观察植物体内的真菌菌丝、吸器等结构或分生孢子器、锈菌性子器、锈子器、夏孢子堆等内部结构时,可用刀片将具这些结构的植物组织切开,使它们裸露出来,方能达到观察目的(图版71—2.3,图版108—3.4)。

(二)样品的抽气处理

对于感病的植物材料来讲,由于细胞间隙存在空气,从而样品材料在随后的固定时,通常漂浮在固定液的表面,这样会直接影响固定效果,故对样品需做特殊的抽气处理。常规的抽气方法是植物材料移入具固定液的小瓶内,用注射器反复抽气,直到使小块材料沉至瓶底;也可用台式真空泵进行抽气,但这两种方法所需的时间过长,并且抽气效果不佳。近年来,作者对感病材料的抽气方法进行了改进,明显缩短了抽气时间(马远利,康振生,魏国荣,1993),该方法的主要步骤如下:

1. 将感病的植物组织先切成 $1\text{cm} \times 2\text{cm}$ 的条块,置于直径为2cm的试管中,随后将 $4\text{cm} \times 4\text{cm}$ 的尼龙网置入距离心管底3cm的部位,加入3%戊二醛固定液,使其液面刚淹没尼龙网为止。由于尼龙网的阻挡,感病材料不能浮到固定液表。

2. 将试管置于与真空泵相接的干燥器中,开泵抽气3~5分钟。随后关泵,打开进气阀,于3~5分钟内使干燥器中的气压回升到常压状况。在此过程中,感病植物材料由绿色渐变为深绿色,表明固定液已渗入组织内,并且叶片最终沉于试管底部。

3. 取出感病材料,于固定液中将材料四周边缘切除,最后将材料切成 $1\text{mm} \times 2\text{mm}$ 的样块,用于固定。

近年来,作者一直采用改进的抽气法处理感病植物材料,大量的电镜观察表明该方法

对植物细胞和真菌细胞的结构无任何损伤。由于该方法抽气快速,特别适宜于细胞化学研究中前包埋技术的需求。前包埋技术一般要求缩短前固定的时间,以减少植物或真菌细胞体表化学成分的损失。

改进抽气法之所以能快速完成抽气过程,其主要原因是当抽气时,植物细胞间隙的空气随之被抽去。而在样品由负压状态恢复到常压过程中,样品被阻而不能与空气接触,这样便迫使固定液渗入植物细胞间隙,样品沉入固定液中。常规抽气处理,样品处于固定液表,空气可反复进入植物细胞间隙,因而一般抽气所需时间较长。

二、电镜样品的常规制备技术

(Preparation of specimen for electron microscopy)

(一)透射电子显微镜样品的制备

1. 固定(Fixation)

固定是指用化学固定剂迅速杀死真菌和植物细胞,使细胞中的各种细胞器以及大分子保持生活状态的结构,并且能牢固地保持在原来的位置上。尽管化学固定方法多种多样,但目前广泛使用的方法是戊二醛—钨酸双重固定法。

戊二醛(Glutaraldehyde, $C_5H_8O_2$)是一种毒性不太大的良好固定剂,穿透能力较强,具有两个醛基,对细胞结构有很高的亲和力。它具有稳定糖元,保存核酸、核蛋白的特性,尤其对微管、内质网等细胞膜系统具有很好的固定作用,缺点是不能保存脂肪,无电子染色作用。

钨酸(Osmium tetroxide, OsO_4)是一种强氧化剂,其水溶液在室温下易挥发、剧毒,对眼、鼻、喉粘膜有强列的刺激作用,因而钨酸的配制和使用都必须在通风橱中进行。钨酸与氮原子有较强的亲和力,因此它能与各种氨基酸、肽及蛋白质反应,在蛋白质分子间形成交联,使蛋白质分子被固定,它能与不饱和脂肪酸反应使脂肪得以保存,并且还能稳定脂蛋白,生物膜中的主要成分磷脂蛋白,同时具有强烈的电子染色作用,可增强样品图像的反差。但是,钨酸对大部分碳水化合物及糖元无固定作用,并且其穿透样品的能力较弱。

采用戊二醛—钨酸双重固定方法,可以克服两种固定剂的弱点,而获得满意的固定效果。固定时,先将切好的样品于4℃下在4%~6%的戊二醛(磷酸缓冲液, P^H 6.8, 0.025M)中放置3~6小时,最长不超过16小时。随后,将样品用缓冲液冲洗4~6次,每次间隔15~20分钟。最后用1%~2%的钨酸将样品在4℃下固定1~2小时,并用缓冲液冲洗4次。注意固定的时间长短,固定剂的浓度及种类,因不同的样品材料会有所不同,但并非是固定时间越长越好,如钨酸固定过长会引起样品材料变脆,不利于切片,若戊二醛固定时间过短,会直接影响到细胞质和膜系统的观察效果。

2. 脱水(Dehydration)

由于常用包埋剂是非水溶性的,只有将样品细胞中的游离水分彻底清除,非水溶性的包埋剂才能渗入细胞,因此,样品必须经脱水过程。

常用的脱水剂为乙醇或丙酮,两者既能与水混溶又能与包埋剂混溶。样品的脱水应由

低浓度逐级向高浓度进行,以免引起细胞的收缩。从 20%→30%→50%→70%→80%→90%→95%→无水丙酮(乙醇)(2~3 次),每步 20~30 分钟。脱水过程需在 4℃ 下进行。样品若不能在当天进行渗透,可于 70%丙酮(乙醇)中于 4℃ 下放置过夜。

3. 渗透与包埋(Infiltration and Embedding)

渗透的目的是用包埋剂逐渐将组织中的脱水剂置换干净,使细胞内外所有的空间都被包埋剂所充填;包埋是将浸透好的样品块放入模具中,灌上包埋剂,经加温聚合,包埋剂硬化,制成样品包埋块。这样样品既获得了坚固的支持,又能经受超薄切片的切割操作。包埋块的好坏直接影响到随后超薄切片的质量,要想获得理想的切片,一般要求包埋块的硬度与弹性应适中,而这一特征往往与包埋剂的种类密切相关。

理想的包埋剂应具有以下性质:粘度低,容易浸透;聚合均匀,聚合后体积收缩小;能耐受电子束轰击,高温下不变形;对细胞成分抽提作用小,精细结构保持良好;本身在电镜下不是可见结构;有良好的切割能力,切片易染色。

目前,广泛使用的包埋剂为环氧树脂,它具有三维交联结构,聚合收缩率小,均匀,对组织损伤小,耐电子束的轰击,但切片较困难,染色后反差较弱。环氧树脂中有不同类型的包埋剂,如 Epon, Araldite, Spurr 等,并且不同类型的配方,其特点各异。因此,可根据样品材料的特征,选择相应的配方。就感病植物和植物病原真菌材料来讲,一般采用以下配方较为适宜:

DDSA(十二烷基琥珀酸酐)	28.5g
Araldite6005	11.0g
Epon812	15.5g
DMP-30(2,4,6-三(二甲氨基甲基)苯酚)	0.8ml

配制包埋剂时,先将前三种试剂充分混合搅匀,然后加入适量的 DMP-30。需注意的是 DMP-30 具致癌作用,操作中应加小心。

样品的渗透与包埋的具体过程分为浸透、包埋、聚合三个步骤。

(1)浸透:样品经无水丙酮脱水后,用不同比例的包埋剂进行浸透:无水丙酮→2/3 无水丙酮+1/3 包埋剂(1 小时)→1/2 无水丙酮+1/2 包埋剂(1 小时)→1/3 无水丙酮+2/3 包埋剂(1 小时)→纯包埋剂(12 小时或过夜)→包埋处理。

由于环氧树脂与乙醇不相溶,用乙醇脱水的材料,脱水后必须用环氧丙烷(Propylen oxide)作转换剂,促使树脂浸入材料。先用环氧丙烷置换二次,随后进行渗透:2/3 环氧丙烷+1/3 包埋剂→1/2 环氧丙烷+1/2 包埋剂→1/3 环氧丙烷+2/3 包埋剂→纯包埋剂。

(2)包埋:向包埋模具小槽内加入少许包埋剂,用牙签将浸透好的材料放入模具槽内,并向槽内加满包埋剂。随后,将模具于 35℃ 的恒温箱中,放置 30 分钟至 1 小时后取出,用牙签对模具槽中样品材料的位置和方向加以调整,以便利于随后的切片过程。

(3)聚合:将包埋后的材料于恒温箱内进行加温聚合,聚合温度为 35℃,45℃ 和 60℃,聚合时间分别为 12,12 和 48 小时。聚合后,包埋剂由凝胶体变为固态,其包埋块可用于切片。